

「霊長類学・ワイルドライフサイエンス・リーディング大学院」による派遣研究者報告書

(当経費の支援を受けての出張後、必ずご提出ください)

| | |
|---------------|------------|
| 2024年 11月 22日 | |
| 所属部局・学年 | 野生動物研究センター |
| 氏名 | 島 遼 |

| |
|--|
| 1. 派遣国・場所 (〇〇国、〇〇地域) |
| WRC |
| 2. 研究課題名 (〇〇の調査、および〇〇での実験) |
| 生物学分析実習 |
| 3. 派遣期間 (本邦出発から帰国まで) |
| 2024年11月11日 ~ 2024年11月18日 (6日間) |
| 4. 主な受入機関及び受入研究者 (〇〇大学〇〇研究所、〇〇博士/〇〇動物園、キュレーター、〇〇氏) |
| 村山美穂先生、佐藤悠先生 |
| 5. 所期の目的の遂行状況及び成果 (研究内容、調査等実施の状況とその成果：長さ自由) |
| 写真(必ず1枚以上挿入すること。広報資料のため公開可のもの)の説明は、個々の写真の直下に入れること。別途、英語の報告書を作成すること。これは簡約版で短くてけっこうです。 |
| 【実習の目的】 動物から抽出したDNAサンプルをどのように分析するのか、手法を学ぶ。羽毛サンプルからDNAを抽出し、PCRおよびDNAシーケンサーによる塩基配列決定によって、その羽毛の種を同定する。種判別にはmtDNA COI領域を用いる。さらに、抽出したDNAサンプルを用いて雌雄識別を試みる |
| 【サンプリング】 11/11(月)の午前にWRCを出発し、京都御所と鴨川の河原で鳥の羽根のサンプリングを行った。サギやトビ、ハト、カラスと思われる羽根を拾うことができた。DNAは羽根の付け根に付着した細胞から抽出するため、その部分が欠損・汚染されていない羽根を選んだ。 |
| 【実験概要】 サンプリングした全ての羽根から良いものを18サンプル選び、コントロールとして動物園由来の羽根2サンプルを加えた20サンプルで種判別を行った。その後、種が判別できた11サンプルを用いて性判別を行った。さらに、最初の種判別で失敗したサンプルと最初に選ばなかったサンプルを用いて再度種判別を行った[以下、種判別2と呼ぶ]。種判別2ではほとんどのサンプルでシーケンスに失敗していたため、PCR・精製後の工程から再度やり直し、結果を得ることができた。 |
| 【使用したプライマー】 種判別にはmtDNAのCOIという、種内でよく保存されている領域を用いた。 BirdF1: 5'-TTCTCCAACCACAAAGACATTGGCAC-3' BirdR1: 5'-ACGTGGGAGATAATTCCAAATCCTG-3' 性判別にはCHDという領域を用いた。 CHD 2550 F: 5'-GTTACTGATTGCTCTACGAGA-3' CHD 2718 R: 5'-ATTGAAATGATCCAGTGCTTG-3' |
| 【種判別】 プロトコルは以下の通りである。 1. DNA抽出 羽根の付け根から5mm程の部分をカットし、1.5mlチューブに入れた。細胞膜や核膜、タンパク質を溶かす試薬を加え、インキュベートした。エタノールを加えてDNAと他の成分を分けた後、加えたエタノールを除去した。DNAを水に溶かして保存した。 |

「霊長類学・ワイルドライフサイエンス・リーディング大学院」による派遣研究者報告書

(当経費の支援を受けての出張後、必ずご提出ください)

- Nano drop を用いて DNA の濃度を測定した。
- C01 プライマーを用いて PCR を行った。使用した試薬や分量は以下の通りである。

| | |
|----------------------|--------------|
| 2x GCI Buffer | 7.5 |
| H2O | 2.7 |
| dNTP | 2.4 |
| Primer1 (20 μ M) | 0.38 |
| Primer2 (20 μ M) | 0.38 |
| LA Taq | 0.15 |
| Mix Total | 13.5 μ l |
| Template DNA | 1.5 μ l |

チューブをサーマルサイクラーに設置し、アニーリング温度 55 度で 40 サイクル PCR を行った。

4. 電気泳動

1 μ l の Loading Buffer (dye) と 4 μ l の PCR 産物をパラフィルム上で混ぜ合わせ、1.5% の TBE アガロースゲルを用いて 100V, 20 分間電気泳動した。バンドが明瞭に見えたサンプルを選び、次の工程に進んだ。

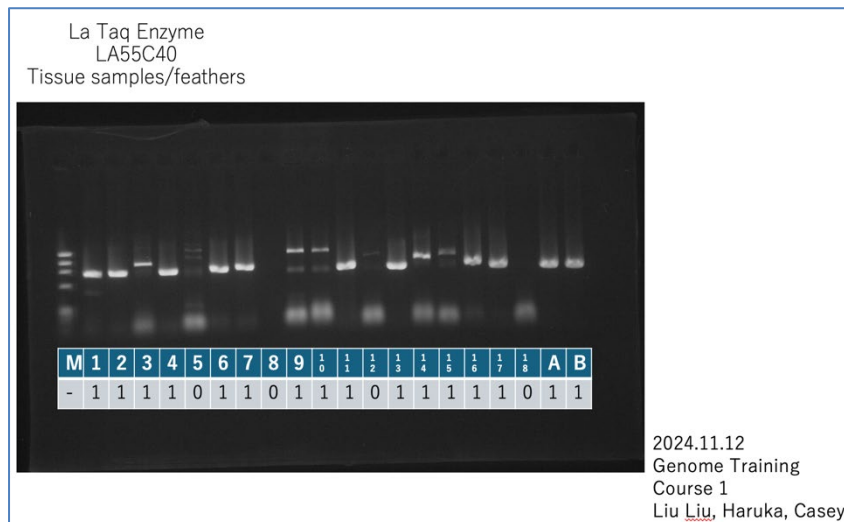


図 1. バンドが明瞭に見えたサンプル(1 を記載)のみシーケンスを行った

5. PCR 産物の精製

PCR 産物にはプライマーや dNTP が含まれているため、精製することによって取り除いた。Binding buffer を加えて遠心することで DNA をフィルターに結合させ、Washing buffer を加えて遠心することで 2 回洗い流した。その後 DNA を水に溶かして 4 度で保存した。

6. シーケンス反応

今回はサンガー法を用いたシーケンスを行った。使用した試薬や分量は以下の通りである。

| | |
|-------------------|-----------|
| BigDye Terminator | 2 |
| B. D. Buffer | 2 |
| F -primer | 1 |
| Mix Total | 5 μ L |
| PCR products | 5 μ L |

チューブをサーマルサイクラーに設置し、アニーリング温度 50 度で 25 サイクル反応を行った。

7. エタノール精製

NaOAc (酢酸) やエタノールを加え、遠心して上澄を除去することを繰り返した。最後は完全に水分を除去し、室温で乾燥させた。

「霊長類学・ワイルドライフサイエンス・リーディング大学院」による派遣研究者報告書

(当経費の支援を受けての出張後、必ずご提出ください)

8. シークエンシング

サンプルに HDFA を加えたものをシークエンシング用のプレートに入れ、95 度で 2 分置いた後にアイスブロック上に 5 分以上放置した。この時、サンプルを入れていない穴にも HDFA を加え、空の穴がないようにした。

9. データ分析

シーケンスが正しく行われたかどうか波形を見て確認し、配列データを fasta 形式で保存した。BOLDSYSTEMS (<https://v3.boldsystems.org>) という遺伝子データベースに配列を入力し、種同定を行った。結果は以下の表に示す通りである。

| Name | Date | Place | Condition | Nakamura-san's | Electrophoresis | DNA Concentra | Purity | Identification | Common Name | SEX | ID |
|------|----------|--------------|---------------|----------------|-----------------|---------------|--------|----------------|----------------------|--------------------|----|
| A | 11/11/24 | Zoo | small feather | Unknown | SUCCESS | | 2.6 | 1.56 | Strix uralensis | Fukuro (Owl) | |
| B | 11/11/24 | Zoo | Small feather | Unknown | SUCCESS | | 10.8 | 1.78 | Phoeniconaias n | flamingo | |
| 1 | 11/11/24 | Gosho | Small feather | Mejiro | SUCCESS | | 3.9 | 2.77 | treron sieboldii | Aobato (White-b | メス |
| 2 | 11/11/24 | Gosho | good | Unknown | SUCCESS | | 7.1 | 2.09 | Streptopelia orie | Kijibato (Turtle d | メス |
| 3 | 11/11/24 | Gosho | good | Unknown | SUCCESS | | 7.3 | 1.5 | | | |
| 4 | 11/11/24 | Gosho | good | Unknown | SUCCESS | | 1.8 | 1.58 | Streptopelia orienta | Kijibato | メス |
| 5 | 11/11/24 | Gosho | old | Karasu | FAIL | | 4 | 2.36 | | | |
| 6 | 11/11/24 | Gosho | small feather | Kijibato | SUCCESS | | 2 | 1.99 | Streptopelia orie | kijibato | オス |
| 7 | 11/11/24 | Gosho | good | Kawarabato | SUCCESS | | 6.2 | 1.37 | Streptopelia oriente | kijibato | メス |
| 8 | 11/11/24 | Gosho | small feather | Tobi | FAIL | | 3.3 | 1.37 | | | |
| 9 | 11/11/24 | Gosho | small feather | Kijibato | SUCCESS | | 1.7 | 5.16 | | | |
| 10 | 11/11/24 | Tadasunomori | small feather | Unknown | SUCCESS | | 2.1 | 2.32 | | | |
| 11 | 11/11/24 | Kamogawa | wet | Unknown | SUCCESS | | 1.6 | 1.17 | Columba livia | kawarabato | 不明 |
| 12 | 11/11/24 | Kamogawa | good | Sagi | FAIL | | 1.2 | 7.35 | | | |
| 13 | 11/11/24 | Tadasunomori | small feather | Unknown | SUCCESS | | 2.3 | 2.05 | Streptopelia orie | Kijibato | |
| 14 | 11/11/24 | Kamogawa | wet | Unknown | SUCCESS | | 0.7 | -2.56 | Columba livia | kawarabato | オス |
| 15 | 11/11/24 | Tadasunomori | small feather | Tobi | SUCCESS | | 0.6 | 1.8 | Milvus migrans | tobi (Black Kite) | 不明 |
| 16 | 11/11/24 | Kamogawa | good | Unknown | SUCCESS | | 1.4 | 1.97 | columba livia | Kawarabato | |
| 17 | 11/11/24 | Tadasunomori | good | Unknown | SUCCESS | | 4.6 | 1.28 | Columba livia ?? | kawarabato ?? | メス |
| 18 | 11/11/24 | Kamogawa | old;dirty | Sagi | FAIL | | 2 | 1.47 | | | |

図 2. 1 回目の種判別及び性判別 (黄色でハイライトしたサンプルは 2 回目も行っている)

| Name | Date | Place | Condition | Nakamura-san's guess | Retry DNA extraction :Electrophoresis (11/14) | DNA Concentration (ng/ug) | Purity | Retry: after PCR and purification Electrophoresis (11/18) | Identification | Common Name | SEX | ID |
|------|----------|--------------|------------------|----------------------|---|---------------------------|--------|---|-------------------|-------------------------------------|-----|----|
| 3 | 11/11/24 | Gosho | good | Unknown | SUCCESS | 7.3 | 1.5 | 0 | | | | |
| 5 | 11/11/24 | Gosho | old | Karasu | FAIL | 4 | 2.36 | | | | | |
| 8 | 11/11/24 | Gosho | small feather | Tobi | SUCCESS | 3.3 | 1.37 | 1 | FAIL | | | |
| 9 | 11/11/24 | Gosho | small feather | Kijibato | FAIL? | 1.7 | 5.16 | | | | | |
| 10 | 11/11/24 | Tadasunomori | small feather | Unknown | SUCCESS | 2.1 | 2.32 | 0 | | | | |
| 12 | 11/11/24 | Kamogawa | good | Sagi | FAIL | 1.2 | 7.35 | | | | | |
| 13 | 11/11/24 | Tadasunomori | small feather | Unknown | SUCCESS | 2.3 | 2.05 | 1 | Streptopelia orie | Kijibato | | |
| 16 | 11/11/24 | Kamogawa | good | Unknown | SUCCESS | 1.4 | 1.97 | 1 | columba livia | Kawarabato | | |
| 18 | 11/11/24 | Kamogawa | old;dirty | Sagi | FAIL | 2 | 1.47 | | | | | |
| 19 | 11/11/24 | Gosho | old;broken | Crow | SUCCESS? | 3.4 | 53.37 | 1 | Corvus corone | carion crow(Hashiboso-garasu) | | |
| 25 | 11/11/24 | Gosho | dirty | Unknown | SUCCESS | 2.8 | 32.31 | 1 | Streptopelia orie | Kijibato (Turtle dove) | | |
| 27 | 11/11/24 | Gosho | small feather | pigeon | SUCCESS? | 1 | -0.68 | 1 | Corvus macrorh | Large-billed crow(Hashibuto-garasu) | | |
| 32 | 11/11/24 | Gosho | broken;dirty;old | crow | FAIL | 37.2 | 1.5 | | | | | |
| 33 | 11/11/24 | Gosho | broken;dirty | crow | SUCCESS | 3.3 | 8.34 | 0 | | | | |
| 34 | 11/11/24 | Gosho | small feather | unknown | SUCCESS | 1.9 | -5.92 | 0 | | | | |
| C | | zoo | | owl | SUCCESS? | 69.7 | 1.99 | 1 | Streptopelia orie | Kijibato (Turtle dove) | | |
| D | | zoo | | | SUCCESS | 64.1 | 2.02 | 1 | FAIL | | | |
| E | | zoo | | | FAIL | 2.7 | 48.81 | | | | | |
| カワウ | | Nakamura | | | FAIL | 73 | 1.86 | | | | | |

図 3. 2 回目の種判別 (性判別は行っていない)

合計 14 サンプルにおいて、アオバト、キジバト、カワラバト、トビ、ハシブトガラス、ハシボソガラスの 6 種を判別することができた。

「霊長類学・ワイルドライフサイエンス・リーディング大学院」による派遣研究者報告書

(当経費の支援を受けての出張後、必ずご提出ください)

【性判別】

種判別の工程で正しく種が判別できた 11 のサンプルと既に性別が分かっているコントロールサンプル 2 つを用いた。鳥類の性染色体は ZW がメス、ZZ がオスであるため、性判別に関わる CHD 領域を増幅した後に電気泳動してバンドの本数を見ることで性別を判断することができる。PCR のプロトコルは以下の通りである。

| | |
|----------------|-----------|
| Ampli taq Gold | 5 |
| Water | 3.5 |
| CHD F-primer | 0.25 |
| CHD R-primer | 0.25 |
| Mix total | 9 μ l |
| Sample | 1 μ l |

アニーリング温度 60 度、35 サイクルで PCR を行ったところ、明瞭なバンドが見られなかった(ラダーマーカーもきちんと出ていなかった)ため別条件で再実験した。アニーリング温度が高すぎたためと考えられる。

再実験 PCR プロトコル

| | |
|------------------|-----------|
| Multiplex enzyme | 5 |
| Z: USP1-primer | 0.1 |
| Z: USP3 -primer | 0.1 |
| W: INT-F-primer | 0.1 |
| W: Int-R-primer | 0.1 |
| Water | 2.6 |
| Mix total | 8 μ l |
| Sample | 2 μ l |

アニーリング温度 55 度、45 サイクルで PCR を行った。電気泳動の結果は以下のようになり、9 サンプルが確実に性別が判明した。バンドの位置が異なるのは種ごとに該当領域の長さが異なるためだと考えられる。

Sex Identification (retry)

2024.11.14
MM55C45
USP1/USP3 primers
INT-f/INT-r primers
Feathers
Gel 1.5%
100V/20 min

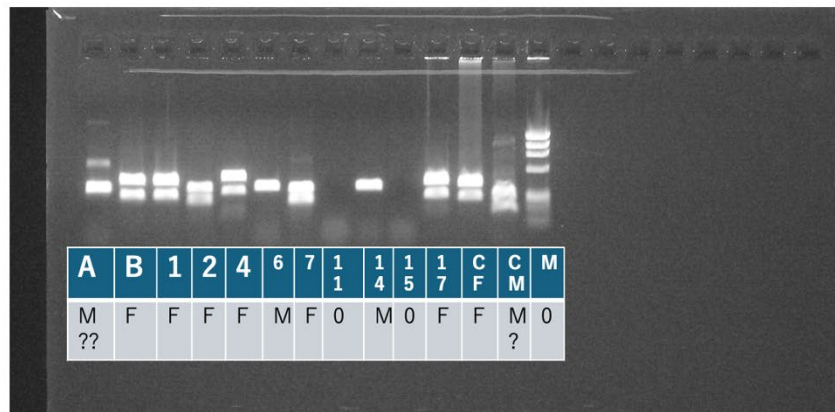


図 4 . 2 回目の性判別の結果

[考察]

今回採取した御所・鴨川のサンプルではハト類が多く見られた(11/14 サンプル)。このエリアにハトが多く生息している可能性や、ハトの羽毛が抜けやすい・風化しにくいなどの特徴を持っている可能性、そして羽毛の先の DNA がハトでは分解されにくいなどの複数の可能性が示唆された。また、性判別では、最初は明瞭なバンドが出なかったが、再実験時の PCR でアニーリング温度を変えると 1 本または 2 本のバンドを得ることができた。アニーリング温度は高温すぎるとプライマーが DNA に接着しにくく、低温すぎると

「霊長類学・ワイルドライフサイエンス・リーディング大学院」による派遣研究者報告書

(当経費の支援を受けての出張後、必ずご提出ください)

目的領域以外も増幅させてしまうため、調節が難しいのだと分かった。今回の実験ではサンプルの DNA 濃度が低かったため、アニーリング温度が 60 度では増幅が難しかったのだと考えられる。鴨川で拾ったサギと思われるサンプルは DNA 抽出の時点で全て失敗した。これは羽毛が水に濡れていたため DNA が分解されてしまったのだと考えられる。また、サンプル C はシロフクロウの羽であったが、なぜかキジバトだと種同定された。キジバトの DNA がコンタミした、もしくはフクロウの DNA の大半が失われてしまったと考えられる。DNA 実験においてコンタミを防ぐことの重要性がよく理解できた。

・ 6 種(アオバト・カワラバト・キジバト・ハシボソガラス・ハシブトガラス・トビ)発見した

[感想]

御所内にハシブトガラスとハシボソガラスの両方が生息していることが面白いと感じた。カラスやハトにも多様な種があることを知り、注意して街中を歩いてみたいと感じた。また、最初はメジロだと思っていた緑色の羽毛がアオバトだと判明して驚いた。動物の見た目だけでは分からないことを調べられる遺伝分析は、今後の野生動物調査でも大いに役立つと思った。

6. その他 (特記事項など)

実験を計画・補助して下さった村山美穂先生、佐藤悠先生、TA の Fadel さんと Mohamed さん、そして一緒に実験や考察を行った Casey, Liu Liu, Xolali, 中村さんに感謝いたします。